



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

의학석사 학위논문

섬유모세포 성장인자 (FGF)가
이식된 지방과 근육에 미치는 영향
: Rat 실험연구

**(Effect of fibroblast growth factor on the
intramuscularly-injected fat and the muscle
morphology: an experimental study in rats)**

2017 년 8 월

서울대학교 대학원
의학과 성형외과학 석사과정
홍진명

의학석사 학위논문

섬유모세포 성장인자 (FGF)가
이식된 지방과 근육에 미치는 영향
: Rat 실험 연구

**(Effect of fibroblast growth factor on the
intramuscularly-injected fat and the muscle
morphology: an experimental study in rats)**

2017 년 8 월

서울대학교 대학원
의학과 성형외과학 석사과정
홍 진 명

국문 초록

서론: 본 연구에서는 섬유모세포 성장인자(Fibroblast growth factor, FGF)의 일종인 Fiblast[®] (Trafermin)를 이용하였을 때 이식된 지방에 조직학적 변화를 줄 수 있는지, 그리고 지방을 근육에 이식하였을 때 근육의 형태학적인 변화가 발생하는지 알아보고자 하였다.

방법: 수컷 랫트(Wistar rat) 18마리를 이용하여 실험을 진행하였다. 지방만 이식한 그룹, 지방과 FGF 를 이식한 그룹으로 나누었으며 각 그룹에서 Gluteus superficialis muscle에 지방 혹은 지방과 FGF를 이식하였고 대조군으로 반대쪽 근육에 식염수(Phosphate-buffered saline, PBS)를 주사하였다. FGF의 반감기를 고려하여 1주일 간격으로 3회를 추가로 주사하였다. 3개월 후 희생하여 조직병리 슬라이드를 만들었으며 H&E 염색을 시행하였다. 현미경 분석을 통해 이식된 지방의 조직학적 변화와 관련된 지방세포 변성(adipocyte degeneration), 섬유화(fibrosis), 염증(inflammation), 혈관생성(angiogenesis) 4가지 항목에 대해서 비교 분석을 시행하였고 근육의 변화는 근육의 직경과 근섬유의 직경을 측정하여 비교하였다.

결과: 지방세포 변성, 섬유화, 염증, 혈관생성 4가지 항목에 대해서 비교 분석을 시행하였으나 지방 이식만 시행하였을 때와 FGF를 추

가하였을 때 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 혈관의 생성은 FGF를 추가하였을 때 통계적인 유의성은 없었지만 혈관 생성에 긍정적 경향을 보여주었다. 근육에 지방이식 하였을 때 근육의 직경은 지방의 부피를 제외하면 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았지만 근섬유의 직경은 지방만 이식하였을 때와 FGF를 추가하였을 때 모두 통계적으로 유의하게 직경이 증가하였다.

결론: 본 연구에서는 지방이식 시 FGF를 추가하는 것이 이식된 지방의 조직학적 변화에 긍정적인 영향을 미치지 않는다고 나타났다. 지방이식은 근육의 부피 증가를 위하여 사용되었을 때 근육 자체의 직경을 줄이는 유해한 영향을 미치지 않았으나 현미경적으로 근섬유의 직경을 증가시키는 효과가 있었다. FGF를 근육 내 지방 이식 시 추가하였을 때에도 근육에 임상적으로 의미 있는 차이를 보여주지 않았다. 향후 장기적인 관찰과 약물의 지속적인 공급 시스템을 활용한다면 FGF의 의미 있는 역할을 찾을 수도 있다고 생각한다.

주요어 : 지방이식, 섬유모세포 성장인자, **FGF, Fiblast**, 근섬유

학번 : 2013-21716

목 차

국문 초록	i
목차	iii
List of tables	iv
List of figures	v
I. 서론	1
II. 연구 대상 및 방법	3
III. 연구 결과	10
IV. 고찰	15
V. 결론	24
VI. 참고 문헌.....	25
Abstract.....	31

LIST OF TABLES

Table 1. Semi-quantitative scoring of fat degeneration between 2 groups	12
Table 2. Semi-quantitative scoring of fibrosis between 2 groups.....	12
Table 3. Semi-quantitative scoring of inflammation between 2 groups.....	12
Table 4. Semi-quantitative scoring of angiogenesis between 2 groups.....	13
Table 5. Comparison of 2 groups with average.....	13
Table 6. Gross diameter and fiber diameter of muscle between 3 groups.....	13

LIST OF FIGURES

Figure 1. Group I – (Right) Fat + FGF injection, (Left) PBS injection, POD# 3 months.....	8
Figure 2. Group II – (Right) Fat + PBS injection, (Left) PBS injection , POD# 3 months.....	8
Figure 3. Gross diameter of Gluteus superficialis muscle (x100) (Group II fat + PBS injection muscle).....	9
Figure 4. Diameter of Gluteus superficialis muscle fiber (x400) (Group II fat + PBS injection muscle).....	9
Figure 5. Gross diameter of Gluteus superficialis muscle between 3 groups.....	14
Figure 6. Diameter of muscle fiber between 3 groups	14
Figure 7. Effect of bFGF dose on the percentage of adipose tissue newly formed 4 weeks after implantation of collagen-PP scaffolds incorporating gelatin microspheres containing different amounts of bFGF.....	23

I. 서론

다양한 이식물질이 항 노화 시술과 미용수술을 위해 개발되고 있다. 다양한 이식물질 중 대표적인 것 중 하나는 지방이식으로 최초의 지방 이식은 1893년 Neuber가 일측성 반안면 왜소증(Unilateral hemifacial atrophy) 환자에서 시행한 것으로 알려져 있다. [1] 지방이식은 다양한 시행착오를 거쳐 Founier 와 Illouz에 이르러 현재 널리 쓰이는 방법인 주사기를 통하여 지방을 수득하고 이식하는 방법에 이르게 되었다. [2, 3] 하지만 지방은 이식 후 시간이 지남에 따라 흡수가 되어 생존율을 미리 예측하기 힘들다는 치명적 단점이 있다. [4-8] 이러한 시간 경과에 따른 지방의 흡수를 설명하기 위해서 여러 가지 가능성이 제기되었지만 [9, 10] 이식 된 지방에 충분히 혈액 공급이 이루어지지 않을 경우 생존율이 저하된다는 점은 여러 연구를 통하여 증명되었다. [11, 12] 이식된 지방 세포는 첫 4일 동안 혈장을 통한 영양 공급(plasmatic nutritional support)을 통하여 생존 하지만 지속적인 생존을 위해서는 모세혈관의 생성이 필수적이며 혈관 신생(angiogenesis)은 성장 인자의 영향을 직·간접적으로 받는다고 알려져 있다. [13] 대표적으로 지방 생착에 도움이 된다고 알려진 성장인자는 혈소판 풍부 혈장(PRP)과 표피 성장 인자(EGF)가 있다. [14-16] 섬유모세포 성장인자(Fibroblast growth factor, FGF) 또한 혈관의 생성과 지

방의 생성에 중요한 역할을 담당한다고 알려져 있다. [17] 많은 성장인자와 마찬가지로 FGF 또한 체내에 주입되었을 때 반감기가 짧아 작용 시간이 짧다는 문제 때문에 이식된 지방에 FGF를 일정한 농도로 유지시키기 위해서 여러 가지 약물 지속방출 시스템이 개발되고 있다. [18-21] 하지만 FGF 지속방출 시스템은 동물 실험에서 행해진 것으로 임상적으로 바로 적용하기에는 현실적 제약이 있다. Fiblast® (Trafermin, Kaken pharmaceutical, Tokyo, Japan)은 FGF의 일종으로 만성 창상 영역에서 흔히 사용되는 약물로 본 논문에서는 임상적으로 활용 가능한 Fiblast® (Trafermin)를 이용하여 이식된 지방에 도움이 될 수 있는지 알아보려고 하였다.

또한 지방이식은 임상적으로 지방의 양이 부족한 지역에 시행되어 볼륨감을 개선하는 것뿐 아니라 근육내부에도 시행되어 근육의 부피와 윤곽을 개선시키는 데에도 사용된다. [22] 임상적으로 근육의 부피 증가는 지방주입에 따른 부피 증가 효과로 생각되지만, 이번 실험에서는 근육에 지방 이식을 하였을 때 지방에 의한 부피 증가를 제외하고 근육 자체에 미치는 영향을 조직학적인 변화에 초점을 맞추어 평가를 하고자 하였다. 이를 위해 지방이식 기술을 근육내에 실시하였을 때 관계된 조직학적 반응, 그리고 FGF를 추가로 투입하였을 때 달라지는 조직학적 변화를 동물실험을 통해 정량적으로 규명하여 현재 시행되고 있는 근육 확대 기술의 안정성에 대한 근거를 제시하고자 한다.

II. 연구 대상 및 방법

1. 실험동물과 약물

이 연구에서 실험동물로 12주령의 몸무게 490–550g (평균 529.6g)의 수컷 랫트(Wistar Rat) 18마리를 구입하여 사용하였다. Wistar Rat는 과거 지방 이식의 효과를 평가하기 위한 실험에서 널리 사용되었던 동물이다. 구입 후 사료 및 생활조건이 일정하도록 유지하여 동물 보관실에서 1주일 간의 순응과정을 거친 후 건강한 개체를 선별 후 실험을 진행 하였다. 무작위 법을 이용하여 군 분리를 실시하였으며, 동물의 개체식별은 사육 상자 별 tag 표시법을 이용하였다. 실험동물 사육관리는 “Animal care and Use Committee of Seoul National University”의 기준을 따랐다. FGF (Fiblast®, Trafermin 500µg (600000IU))는 (주) 대웅제약의 제품을 사용하였다.

2. 이식할 지방의 준비

랫트(Wistar rat)는 졸레틸 (Zoletile, Tilemine 125mg, Zolazepam 125mg) 30mg/kg와 럼폰 (Rompun, Xylazine hydrochloride, 23.32mg/ml) 5mg/kg의 혼합물을 근육 내 주사하는 방법으로 마취하였으며 실험 진행 중 필요할 경우 추가 마취를 실시하였다. 이식에 사용될 지방을 채취하기 위하여 서혜부를 면도

후에 베타딘 용액으로 소독을 시행하고 소독된 수술 기구를 이용하여 한쪽당 2.0 cm 의 절개를 가하고 주변 조직과의 박리를 통해 서혜부 지방 패드(inguinal fat pad)를 분리하였다. 지방이 충분하지 않을 경우 박근(gracilis muscle) 과 외빗근 (external oblique muscle)사이를 추가로 박리하여 방광 앞 부위에 있는 (preurinary bladder fat pad) 지방 조직을 추가로 수득하였다. 지방 조직은 식염수(Phosphate-buffered, saline, PBS)로 세척 후 소독된 마른 거즈로 닦아주었으며 블레이드 15번을 사용하여 16G 메디컷을 통과할 수 있을 때까지 작은 조각으로 절단하였다. 총 수득량은 주사기에 넣었을 때 총 0.5ml가 되도록 하였다. 이후 가공된 지방은 2가지 군으로 나누어 1) 0.5ml fat + 0.5ml PBS 2) 0.5ml fat + 0.5ml FGF (1 μ g이 함유되도록 2 μ g/cc 농도로 희석하여 사용함)으로 만들었다. 지방 공여부는 5-0 나일론을 이용하여 봉합하였다.

3. 군의 분리 및 지방의 이식

랫트(Wistar rat)를 두 가지 그룹으로 나누어 실험을 진행하였다.

Group I – Wistar Rat (n=9)

Gluteus superficialis muscle 의 오른쪽에는 FGF를 첨가한 지방을 주입하고 왼쪽에는 동량의 PBS를 주입

Group II – Wistar Rat (n=9) (Control)

Gluteus superficialis muscle 의 오른쪽에는 FGF를 첨가하지 않은 지방을 주입하고 왼쪽 에는 동량의 PBS를 주입하였다.

각 그룹의 숫자는 실험 중 폐사할 수 있는 가능성을 고려하여 8+1 마리로 계획하였다. 지방의 주입은 복와위(Prone position)로 눕힌 후에 털을 면도 후 베타딘 용액으로 소독을 실시하고 등을 절개하고 Gluteus superficialis muscle을 노출 시킨 후 그룹 I, II에 미리 준비한 지방 (Fat + FGF, Fat + PBS, PBS) 1ml를 gluteus superficialis muscle에 이식하였다. 지방 이식 시 최대한 근육의 중앙 부분에 균등하게 이식되도록 주의하였다. 이후 절개 부위는 나일론 5-0 를 사용하여 봉합하였다. 모든 시술의 수술자는 동일하였으며 각 동물은 자신에게서 채취한 지방을 이식 받았고 지방의 채취와 지방이식은 동일 실험일에 시행하였다. 이후 첫 실험 후 1주일 간격으로 총 3회 0.1ml FGF(총 1 μ g 함유)를 추가로 주사하였다. FGF 주입 시 정확히 지방 이식 시행 장소에 주입이 되도록 처음 지방 이식할 때 해당 부위의 피부에 실을 이용하여 태깅하여 위치를 표시하였다.

4. 결과 분석

3개월 후 CO₂ 챔버를 사용하여 랫트를 희생시킨 후 지방이식을 시행한 근육을 채취하였다. 등에 절개를 가하여 gluteus superficialis muscle을 노출 시킨 후 근육을 수득하였다. 지방이 이식된 근육의 중앙 부위는 따로 분리하여 10% 포르말린 용액에 고정 후 파라핀에 포매(embedding)하였으며 파라핀 블록을 절단 시 수술자가 직접 근육 섬유와 주행방향을 확인 후 주행방향에 수직이 되도록 절단하였다. 이후 hematoxylin and eosin (H&E) 염색을 시행하였다. 현미경 분석은 슬라이드 당 3개의 랜덤 필드(x100)에서 지방세포의 변성(adipocyte degeneration), 섬유화(fibrosis), 염증(inflammation) 정도를 관찰하였으며 Grade 0 (Absent), Grade I (<20%), Grade II (20–50%), Grade III (>50%)로 판정하였다. 혈관의 생성은 3개의 랜덤 필드(x400)에서 각 필드 안에 존재하는 모세혈관의 수를 측정하는데 Grade 0 (Absent), Grade I (<25개/1HPF), Grade II (25–100개/1HPF), Grade III (>100개/1HPF)으로 정하였다.

또한 지방만 근육에 이식 했을 때와 FGF를 첨가한 지방을 근육에 이식했을 때 근육에 미치는 영향을 보기 위해 1) Gluteus superficialis muscle의 직경을 #1–#8 랫트에서 측정하였는데 근육의 직경은 현미경 100배 확대 하에 각 슬라이드의 3개의 랜덤 필드에서 각각 5개의 측정값을 구한 후 각 필드에서 최대값과 최소

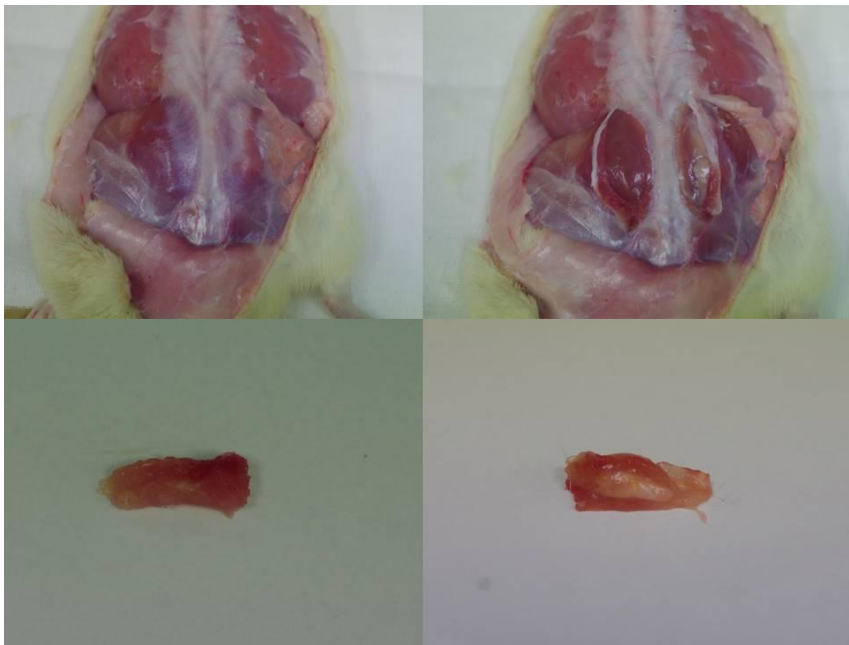
값을 제외한 3개의 측정값을 구하고 전체(9개)의 평균 값을 측정하였으며 2) 근섬유의 직경은 400배 확대 하에 각 슬라이드의 3개의 랜덤 필드에서 측정하되 근섬유는 변이(variation)가 좀 더 많기 때문에 각 필드당 10번을 측정한 후 각 필드 의 최대값과 최소값을 제외한 전체(24개)의 평균값을 측정하였다.

5. 통계학적 분석

두 그룹에서 지방세포의 변성, 섬유화, 염증 정도의 차이와 혈관의 생성 차이를 보기 위해 카이 스퀘어 테스트(Chi square test)를 사용하였다. 분할표(contingency table)에서 각 cell의 샘플 사이즈가 작은 경우 (5보다 작은 경우) 카이 스퀘어 테스트를 수행하기 위해서 Fisher 정확 검정(Fisher's exact test)을 시행하였다.

세 그룹 (PBS, Fat + PBS, Fat + FGF)에서 근육의 직경과 근섬유의 직경의 차이를 알기 위해서 ANOVA 검정을 사용하였으며 통계 프로그램으로는 R을 사용하였다. (R Core Team (2014). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.)

**Figure 1. Group I – (Right) Fat + FGF injection, (Left) PBS injection,
POD# 3 months**



**Figure 2. Group II – (Right) Fat + PBS injection, (Left) PBS injection,
POD# 3 months**

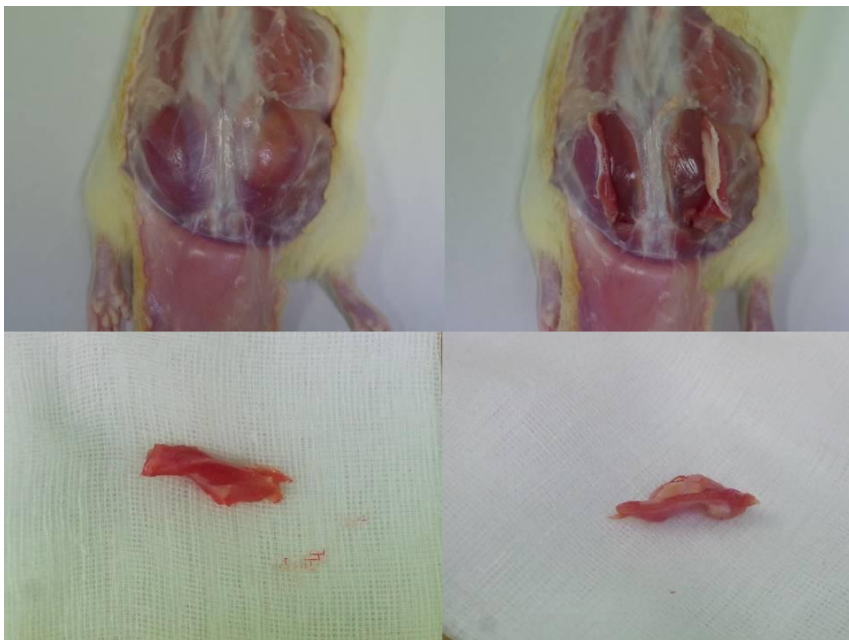


Figure 3. Gross diameter of Gluteus superficialis muscle (x100)

(Group II: fat + PBS injection muscle)

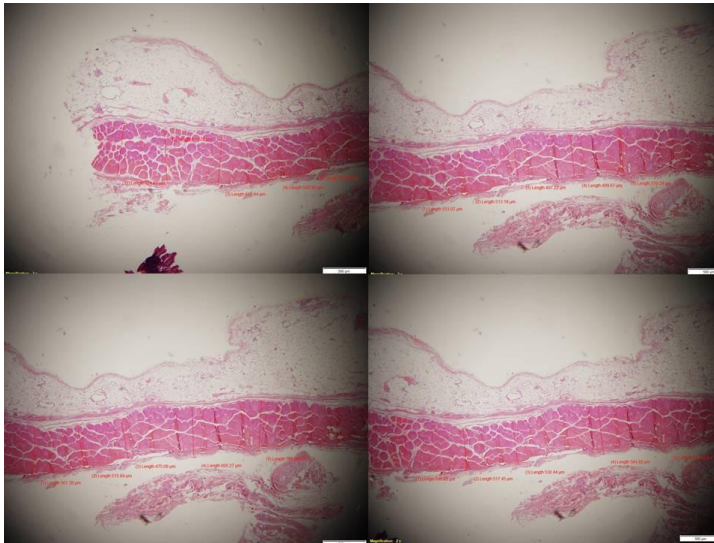
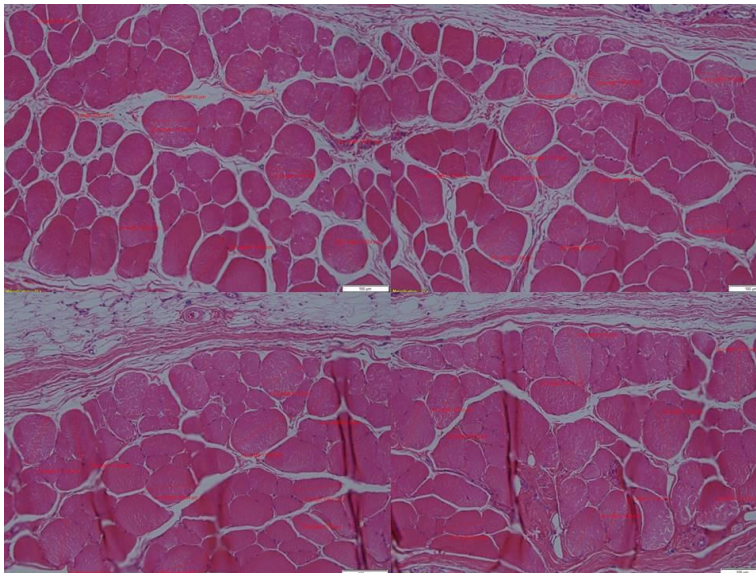


Figure 4. Diameter of Gluteus superficialis muscle fiber (x400)

(Group II: fat + PBS injection muscle fiber)



III. 연구 결과

FGF 가 이식된 지방에 미치는 영향 분석

결과 분석은 반정량 분석(semi-quantitative analysis)을 사용하였으며 지방세포의 변성, 섬유화, 염증, 혈관 생성 4개의 항목에 대해서 Grade 0 – Grade III 로 카운팅 실시하였고 앞에서 언급한 바와 같이 지방세포의 변성, 섬유화, 염증의 경우 Grade 0 (Absent), Grade I (<20%), Grade II (20–50%), Grade III (>50%)으로, 혈관 생성의 경우 Grade 0 (Absent), Grade I (<25개/1HPF), Grade II (25–100개/1HPF), Grade III (>100개/1HPF)로 판정하였다. 스코어링 한 결과는 Table 1–4와 같으며 지방세포의 변성, 섬유화, 염증 3개의 항목은 두 군의 평균을 비교하였을 때 p-value 가 모두 유의하지 않았으며 두 그룹간의 차이를 판단할 수는 없었다. (Table 5) 혈관 생성의 경우 두 그룹 간의 등급 분포에서는 유의한 차이가 없었으나 평균을 비교하였을 때 p-value 가 0.16으로 유의한 차이는 없지만 FGF 를 첨가한 그룹에서 혈관 생성이 좀 더 잘 되는 경향을 보였다.

근육에 지방 이식 혹은 지방 + FGF 이식 했을 때 근육에 미치는 영향 분석

지방을 근육에 이식하였을 때 혹은 지방과 FGF를 근육에 이식하였을 때 PBS만 주사한 근육에 비해서 근육의 직경과 각 근섬유의 두께에 차이가 발생하는지 알아보기 위해 세 그룹에서 근육의 직경, 근섬유의 직경, 표준편차를 정리하였다. (Table 6) 세 그룹간의 차이를 비교해야 하기 때문에 카이 스퀘어 테스트 대신 ANOVA 분석을 사용하였다.

ANOVA 분석을 하였을 때 근육의 직경은 p-value가 0.83으로 통계적으로 유의한 차이는 없었다. 근육의 직경은 이식된 지방을 제외하고 근육의 부분만을 켜 것이며 세 그룹간에 직경 차이는 보이지 않았다. (Figure 5)

반면에 근섬유의 직경은 ANOVA 분석을 하였을 때 $p < 0.05$ 으로 각각의 그룹간에 유의한 차이가 있었다. Control과 fat, fat과 fat + FGF, control과 fat + FGF 각각의 그룹간 통계적인 유의성 검증을 시행하였고 순서대로 $p < 0.01$, $p = 0.04$, $p < 0.01$ 로 각 그룹간에 통계적으로 유의한 차이가 있었다. (Figure 6)

평균으로 비교하였을 때 control 그룹의 평균 직경이 $104.6 \mu\text{m}$ 로 control 그룹에 비해서 fat 그룹은 $26.77 \mu\text{m}$, fat + FGF 그룹은 $21.49 \mu\text{m}$ 증가한 결과를 보였다. Control 그룹에 비해 fat 그룹은 근섬유의 직경이 25.6%, fat + FGF 그룹은 20.5% 증가된 결과를

보였다. 근섬유의 직경은 오히려 지방 이식만 시행하였을 때 FGF를 첨가하였을 때 보다 평균이 $5.28\ \mu\text{m}$ 높았고 통계적으로 유의한 차이는 있지만 임상적으로는 크게 의미 없는 차이라고 생각된다.

Table 1. Semi-quantitative scoring of fat degeneration between 2 groups

	Grade 0	Grade I	Grade II	Grade III	Average
Fat	3	9	9	3	1.50
Fat + FGF	1	12	10	1	1.46
χ^2 -value = 16.71 p-value					0.05

Grade 0 (Absent), Grade I (<20%), Grade II (20~50%), Grade III (>50%)

Table 2. Semi-quantitative scoring of fibrosis between 2 groups

	Grade 0	Grade I	Grade II	Grade III	Average
Fat	5	10	6	3	1.29
Fat + FGF	3	12	7	2	1.33
χ^2 -value = 7.8 p-value					0.61

Grade 0 (Absent), Grade I (<20%), Grade II (20~50%), Grade III (>50%)

Table 3. Semi-quantitative scoring of inflammation between 2 groups

	Grade 0	Grade I	Grade II	Grade III	Average
Fat	0	10	9	5	1.79
Fat + FGF	2	9	11	2	1.54
χ^2 -value = 12.05 p-value					0.05

Grade 0 (Absent), Grade I (<20%), Grade II (20~50%), Grade III (>50%)

Table 4. Semi-quantitative scoring of angiogenesis between 2 groups

	Grade 0	Grade I	Grade II	Grade III	Average
Fat	0	15	9	0	1.38
Fat + FGF	0	10	14	0	1.58

$$\chi^2\text{-value} = 3.7 \quad p\text{-value} = 0.09$$

Grade 0 (Absent), Grade I (<25/1HPF), Grade II (25~100/1HPF), Grade III (>100/1HPF)

Table 5. Comparison of 2 groups with average

	degeneration	Fibrosis	Inflammation	Angiogenesis
Fat	1.50	1.29	1.79	1.38
Fat + FGF	1.46	1.33	1.54	1.58
p-value	0.85	0.87	0.27	0.16

Table 6. Gross diameter and fiber diameter of muscle between 3 groups

	Gross diameter		Fiber diameter	
	Average	SD	Average	SD
Control	986.64	253.75	104.60	8.90
Fat	964.04	247.34	131.37	19.18
Fat + FGF	986.65	253.75	126.09	16.14

(μm)

Figure 5. Gross diameter of Gluteus superficialis muscle between 3 groups

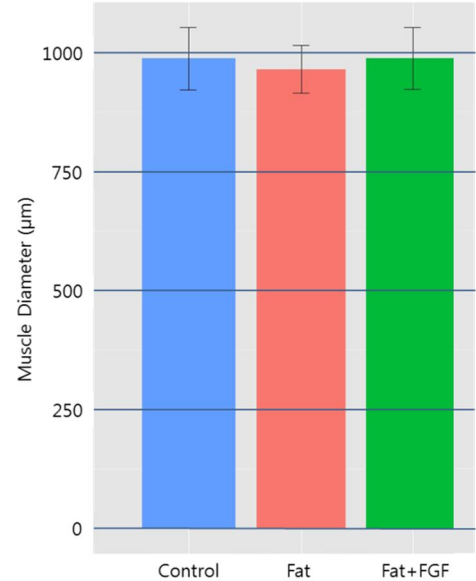
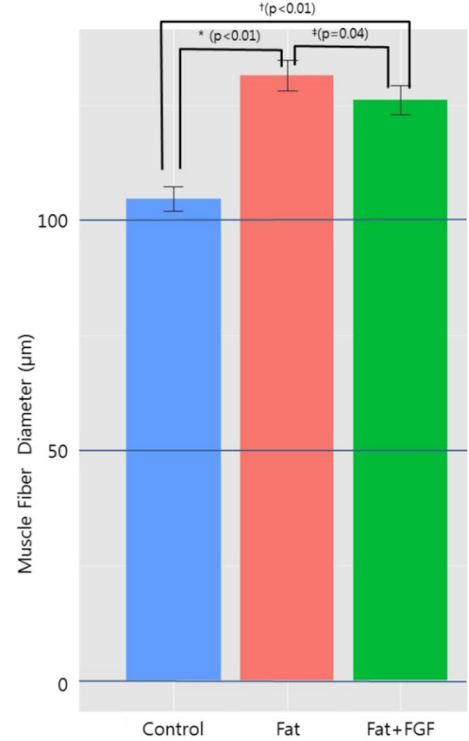


Figure 6. Diameter of muscle fiber between 3 groups



IV. 고 찰

항 노화 시술로서 혹은 함몰 영역의 보충을 위한 지방 이식은 지방 자체의 볼륨감뿐 아니라 피부의 영양에 미치는 효과 때문에 좋은 시술로 각광 받고 있다. [23, 24] 최근에는 간편성과 이전보다 저렴해진 가격의 영향으로 히알루론산(hyaluronic acid)으로 대표되는 필러(Filler) 주입술이 좀 더 자주 시행되는 경향이 있지만 일정 시간이 지나면 흡수되어 재 주입해야 하며 많은 양을 주입할 때 비용이 급격히 상승한다는 한계점 때문에 지방이식은 여전히 매력적인 방법 중 하나이다. 하지만 지방 이식술도 변성(adipocyte degeneration) 과정을 거치며 시간 경과 후 약 50% 에서 80%의 생존률을 보인다고 알려져 있다. [25-27] 지방 이식의 생존률을 증가시키기 위해 최근 시도하고 있는 전략은 크게 두 가지로 나누어 보면 생착이 보다 잘되는 지방세포의 전구세포(pre-adipocyte)를 분리 후 직접 주입하여 원하는 해부학적 위치에서 분화 되도록 하는 방법과 이미 몸에 존재하는 전구세포가 효과적으로 지방세포로 분화할 수 있도록 환경을 조성하는 방법이 있다. [18] 두 가지 접근 중 후자의 방법이 편리하기에 혈소판 풍부 혈장(PRP), 표피 성장 인자(EGF), 그리고 섬유모세포 성장인자(FGF)를 같이 이식하여 이식된 지방의 생존률을 높이는 방법이 소개된 경우가 많다. [14-17] 이중 FGF는 주입하였을 때

반감기가 짧기 때문에 이식된 지방에 FGF를 일정한 농도로 유지시키기 위해서 다양한 약물 전달 시스템 (gelatin microsphere incorporating FGF-2, FGF-2 loaded poly microsphere 등)이 개발되기도 하였다. [18-21] 하지만 이러한 시스템은 동물 실험에서 행해진 것으로 임상적으로 바로 적용하기에는 한계가 있으며 실험에 사용한 약품이 인체에 사용 가능한 의약품으로 승인되기까지는 많은 시간이 소요된다. 현재 임상적으로 사용되는 FGF와 관련된 성분으로는 성형외과에서 당뇨족(DM foot), 욕창 치료에 자주 사용되는 Fiblast® (Trafermin, Kaken pharmaceutical, Tokyo, Japan)가 있다. 이에 임상적으로 활용 가능한 Fiblast® (Trafermin)을 이용하였을 때 이식된 지방에 도움이 될 수 있는지 알고자 하였다. 다만 FGF는 인체 내에서 반감기가 짧는데 약물 지속 전달 시스템(drug continuous releasing system)을 사용하지 않기 때문에 EGF와 지방이식에 미치는 영향을 조사한 타 논문의 방법과 마찬가지로 반복적으로 주사 하는 것으로 대체하였다. [16] 지방이식의 동물모델로는 New Zealand white rabbit, nude mouse, Wistar rat 등이 사용되는데 이 연구는 지방이식뿐만 아니라 근육에 지방이식을 하였을 때 변화도 관찰 하여야 하기 때문에 지방이 비교적 풍부하고 지방의 수득이 용이하며 근육에 지방 이식이 용이한 동물 모델이 필요하였다. Wistar rat는 지방 이식의 생착에 관한 연구뿐 아니라 근육 내 지방의 생존률의 모델로도 사용된

동물로 이번 연구에 적합하다고 생각하여 이번 실험 모델로 사용하였다. [18, 28, 29] 지방이식 시 FGF의 농도 또한 실험 결과에 큰 영향을 미칠 수 있는데 FGF를 함유한 콜라겐 scaffold를 랫트 지방 패드에 주입하여 지방의 생성을 관찰한 기존 논문에서 FGF의 농도를 0.01, 0.1, 1.0, 10 ($\mu\text{g}/\text{site}$)로 하였을 때 1.0 $\mu\text{g}/\text{site}$ 의 농도에서 가장 높은 지방의 생성이 통계적으로 유의하게 관찰되었기에 이 실험의 농도는 1.0 $\mu\text{g}/\text{site}$ 로 결정하였다. [18] (Figure 7)

이번 결과를 도출함에 있어 지방 이식의 결과를 비교하는데 가장 간단한 방법은 이식된 지방의 크기를 비교하는 것이지만 토끼 귀에 지방을 이식하는 것과는 다르게 [16] 근육에 지방을 이식하는 것은 한 덩어리로 하는 것보다 지방을 근육의 넓은 부위에 균등하게 주입하는 것이 생존에 도움이 되기 때문에 직접적인 정량적 비교가 어려웠다. [28] 이에 현미경으로 지방이식 후 변화를 측정 하고자 하였고 지방세포의 변성(adipocyte degeneration), 섬유화(fibrosis), 염증(inflammation), 이물반응(foreign body reaction), 석회화(calcification), 혈관 생성(angiogenesis) 등의 평가 항목 중 측정이 용이한 지방세포의 변성, 섬유화, 염증, 혈관생성 4가지 항목을 선정하였다. [30]

기존의 FGF 관련 연구와의 재현성 측정을 위해 지방만 이식한 그룹과 FGF와 지방을 같이 이식한 그룹의 결과를 비교 분석

하였지만 4가지 항목 모두에서 (지방세포의 변성, 섬유화, 염증, 혈관 생성) 두 그룹간 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. (Table 4) 기존 연구를 살펴보면, 콜라겐 scaffold에 FGF를 함유하는 gelatin microsphere를 첨가하여 scaffold에 생성된 지방의 면적을 측정한 두 연구에서 모두 FGF를 첨가하였을 때 첨가하지 않은 그룹에 비해 생성된 지방의 양이 유의하게 증가하였다. $1\mu\text{g}$ 혹은 $10\mu\text{g}$ free FGF 를 사용하였을 때는 PBS 그룹에 비해서는 지방의 생성이 유의하게 증가하였으나 gelatin microsphere를 사용한 그룹에 비해서는 유의하게 생성된 지방의 양이 적었다. [18, 20], 소장점막하층 (small intestine submucosa)에 심은 지방전구세포 (preadipocyte)를 nude mouse에 이식 시 FGF를 함유한 poly microsphere를 첨가하여 혈관의 생성을 관찰한 연구에서는 FGF를 첨가하지 않은 대조군에 비해 혈관의 생성이 유의하게 증가하였다. $1\mu\text{g}$ free FGF를 첨가한 그룹은 FGF가 없는 대조군과 큰 차이가 없었다. 이 연구에서는 세포 배양을 통한 *in Vitro* 연구도 진행하였는데, free FGF와 microsphere를 사용한 그룹을 비교해보면 오히려 초기 48시간에는 free FGF 그룹의 지방 세포 수가 더 많았지만 14일째에는 free FGF 그룹은 대조군과 차이가 없어지고 microsphere group은 지방 세포수가 유의하게 증가한 것을 관찰하였다. [17] 지방이식 시 FGF를 fragmin/protamine microparticle을 통하여 공급하여

생존된 지방의 양, 육아조직의 형성을 관찰한 연구에서는 FGF가 공급된 그룹에서 정상 지방조직이 잘 유지되고 육아조직이 덜 형성되는 것을 관찰하였다. Free FGF 그룹은 PBS 그룹에 비해서 지방 조직의 유지나 육아조직 형성 정도는 긍정적 경향을 보였지만 통계적 유의성은 없었다. [31] 기존 연구에서 free FGF를 사용 시 약물 전달 체계를 사용 한 것 보다 지방의 생착 효과가 떨어졌으나 일부 연구에서는 단시간 효과에 있어서 free FGF가 더 우월한 결과를 보이는 것을 볼 때 FGF의 짧은 반감기를 극복하는 것이 실험의 중요한 포인트라고 생각되었다. 기존 연구가 free FGF를 사용할 때에 free FGF를 초기 1회만 주입하였기 때문에 긍정적 결과를 도출하지 못하였다 생각하고 저자는 이번 연구에서 3회를 추가 주입하였다. 하지만 이번 실험 결과 또한 유의한 차이가 없었던 것을 보면 반복적인 FGF 주사로는 짧은 반감기를 극복하지 못했다는 반증일 수 있다. 혹은, 반복된 주사로 인해 실험동물에서 스트레스를 유발하여 스트레스 호르몬이 지방과 근육에 영향을 미쳤을 가능성도 있다.

지방이식에 따른 근육의 직경, 근섬유의 직경 변화는 기존 연구에서 자주 측정하지 않았던 영역으로 새로운 분석 방법이 필요하였다. 근육의 육안적 직경은 근육 발단부(origin)부터 부착점(insertion)까지 변이가 큰데 이를 극복하기 위해 발단부에서 부착점의 중간 지점에서 생검하여 슬라이드를 제작하였으며

슬라이드 분석에 있어서도 반복 측정을 통하여 변이(variation)를 줄이고자 노력하였다. 결과를 보면 fat, fat + FGF를 이식하였을 때 근섬유의 직경은 (세 그룹에서 평균은 100~130um 사이) control 그룹에 비해 fat + FGF 그룹은 $21\mu\text{m}$ (20.5% 증가) fat 그룹은 $26\mu\text{m}$ (25.6% 증가) 직경이 증가하였고 PBS injection 그룹에 비해 통계적으로 유의한 차이가 있었다. 반면 근육의 직경을 보면 세 그룹간에는 유의한 차이가 없었다. FGF 자체는 지방이식에 첨가되었을 때 근육의 직경과 근섬유의 직경에 긍정적 변화를 주지는 못했지만 FGF 와 관계없이 지방이식 유무는 통계적으로 유의하게 근섬유의 직경 증가에 긍정적인 효과를 주었다. 임상적으로 해석하면 지방이식은 근육의 부피 증가를 위하여 사용되었을 때 근육 자체의 직경을 줄이는 유해한 영향을 미치지 않았고 현미경적으로 근섬유의 직경을 증가시키는 효과가 있었다. 근섬유의 직경 증가가 근육의 직경 증가로 연관되지 못한 것은 근섬유의 직경 증가 정도가 근육의 직경증가를 유의하게 증가 시킬 만큼 충분하지 않았기 때문이라고 생각한다.

지방 이식시 근섬유의 비대가 유발 된 것은 특이한 결과라고도 볼 수 있다. Yamada et al. 의 보고에 따르면 FGF는 근육의 세포외기질(extracellular matrix)에 보관되어 있는데 비후화된 근섬유 주변에는 FGF가 더 많이 존재하고 FGF의 활동도(activity) 또한 활성화 되어 있다고 한다. [32] 이번 실험에서 근섬유의

직경이 증가한 것은 FGF의 효과일 가능성이 있지만 지방만 이식한 그룹 또한 근섬유의 직경이 증가한 것을 보면 이식된 지방 조직 내에도 FGF 등의 성장인자가 포함되어 있어 근섬유 직경에 유의하게 영향을 주었다고 해석할 수도 있다. 이번 실험에서 FGF의 첨가 유무가 근섬유 직경 증가에 큰 차이를 불러일으키지 못한 것은 근섬유의 비대에 효과적인 FGF 농도를 제공하지 못했기 때문일 가능성도 있다. 오히려 FGF를 첨가한 그룹에서 근섬유의 굵기 증가가 지방만 이식한 그룹보다 적은 것은 앞에서 언급한 바와 같이 반복된 주사로 인해 실험동물에서 스트레스를 유발하여 스트레스 호르몬이 지방과 근육에 영향을 미쳤기 때문일 수 있다. 최근 여러 연구에서 근육의 성장 혹은 근섬유의 비대는 insulin-like growth factor I의 활성화와 관련이 있다고 보고되고 있는데 [33-36], 근섬유의 비대는 성장인자와 관련이 있음을 알 수 있고 이번 실험에서 근섬유의 비대가 유발된 것은 FGF가 아니라 지방이식에 우연히 포함된 insulin-like growth factor I일 가능성 또한 배제할 수 없다.

본 논문의 한계점으로는 기존연구와 다르게 지방이식에서 FGF의 긍정적 효과를 재현하지 못했는데 FGF 지속 공급 시스템 (continuous FGF delivery system)을 사용하지 않아 랫트 체내 충분한 FGF 농도 유지에 실패 하였을 가능성이 있다. 간헐적 주입 (intermittent bolus injection) 보다는 조직공학적인 도움을

반아 콜라겐 scaffold 등의 약물 지속 공급 시스템을 활용 한다면 기존 연구와의 재현성에 도움을 줄 수도 있다고 생각한다. 또한 실험 과정 중 1주 간격으로 FGF 주사 시 절개 없이 외부에서 주사를 하기 때문에 정확히 지방이 이식된 근육의 부위에 타겟팅 하기 힘들었다. 이러한 변이를 줄이기 위해서 태깅 확인 후 태깅 주변으로 여러 차례 나누어 주사를 시행하였지만 해부학적 계측점(anatomical landmark)을 설정하면 좀 더 정확한 실험이 될 수 있다고 생각한다. 실험의 테크닉적인 측면 에서 고찰해보면 지방이식을 할 때 근육의 넓은 영역에 균등하게 지방 이식이 되어야 지방이 더 잘 생착 되지만 이번 실험에서 희생 후 근육을 살펴보면 지방이 뭉쳐서 이식된 경우가 많았다. 지방이식 테크닉을 좀 더 연습 후 실험을 진행하였으면 좋았을 것으로 판단된다. 분석 방법에 있어서 근육의 두께 혹은 근육 섬유 두께는 근육 섬유의 수직방향으로 절단하여 슬라이드를 제작 하고 최대한 많은 영역에서 측정하여 평균치를 측정하였지만 Gluteus superficialis의 개체간 차이, 근육의 해부학적인 위치에 따른 개체 내 두께 차이에 대한 교란 요인을 배제할 수 없기에 좀 더 정교한 분석 방법이 필요하다. 마지막으로 지방세포의 변성, 섬유화, 염증소견에 반해 혈관 생성의 경우 FGF를 첨가한 그룹에서 긍정적 경향이 보였는데 장기적인 관찰(long term follow up)을 하면 긍정적인 결과도 도출될 수도 있다고 생각한다

Figure 7. Effect of bFGF dose on the percentage of adipose tissue newly formed 4 weeks after implantation of collagen-PP scaffolds incorporating gelatin microspheres containing different amounts of bFGF. [18]

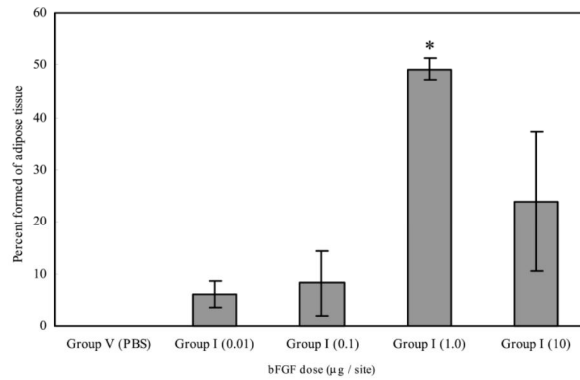


FIG. 4. Effect of the bFGF dose on the percentage of adipose tissue newly formed 4 weeks after implantation of collagen-PP scaffolds incorporating gelatin microspheres containing different amounts of bFGF. * $p < 0.05$; significant against the percentage of adipose tissue formed at the scaffold incorporating microspheres containing bFGF at other amounts.

V. 결 론

본 연구에서는 섬유모세포 성장인자(FGF)와 관련된 Fiblast® (Trafermin)를 이용하였을 때 이식된 지방에 조직학적 변화를 유발 할 수 있는지 그리고 근육에 지방 이식을 하였을 때 발생하는 근육의 형태학적 변화를 알고자 하였다. 지방이식 후 조직학적 소견과 관련된 지방세포의 변성(adipocyte degeneration), 섬유화(fibrosis), 염증(inflammation), 혈관 생성(angiogenesis) 4가지 항목에 있어서 지방이식 시 FGF를 추가하는 것이 통계적으로 유의한 차이가 없었지만 혈관의 생성은 FGF의 긍정적 경향이 보였다. 또한 근육 내 지방이식은 근육 자체의 직경을 줄이는 유해한 영향을 주지는 않았으며 근섬유의 크기 증가에는 긍정적인 효과가 있었다. FGF는 근육 내 지방 이식 시 추가되었을 때에도 근육에 임상적으로 의미 있는 차이를 가져오지는 못했다. 향후 장기적인 관찰과 약물의 지속적인 공급 시스템을 활용한다면 FGF의 의미 있는 역할을 찾을 수도 있다고 생각한다.

VI. 참고 문헌

1. Neuber, F., Fet transplantation. Verh Dtsch Ges Chir, 1893; 22: 66.
2. Fournier, P.F., Facial recontouring with fat grafting. Dermatologic clinics, 1990; 8(3): 523-537.
3. Illouz, Y.-G., The fat cell" graft": a new technique to fill depressions. Plastic and reconstructive surgery, 1986; 78(1): 122.
4. Ersek, R.A., Transplantation of purified autologous fat: a 3-year follow-up is disappointing. Plastic and reconstructive surgery, 1991; 87(2): 219-227.
5. Fagrell, D., et al., Fat cylinder transplantation: An experimental comparative study of three different kinds of fat transplants. Plastic and reconstructive surgery, 1996; 98(1): 90-96.
6. Peer, L.A., The neglected free fat graft. Plastic and Reconstructive Surgery, 1956; 18(4): 233-250.
7. S̃mahel, J., Experimental implantation of adipose tissue fragments. British journal of plastic surgery, 1989; 42(2): 207-211.

8. Šmahel, J., Failure of adipose tissue to heal in the capsule preformed by a silicone implant. *Chirurgia plastica*, 1985; 8(2): 109-115.
9. Nguyen, A., et al., Comparative study of survival of autologous adipose tissue taken and transplanted by different techniques. *Plastic and reconstructive surgery*, 1990; 85(3): 378-386.
10. Ramon, Y., et al., Enhancing the take of injected adipose tissue by a simple method for concentrating fat cells. *Plastic and reconstructive surgery*, 2005; 115(1): 197-201.
11. Crandall, D.L., G.J. Hausman, and J.G. Kral, A review of the microcirculation of adipose tissue: anatomic, metabolic, and angiogenic perspectives. *Microcirculation*, 1997; 4(2): 211-232.
12. Pallua, N., et al., Content of the growth factors bFGF, IGF-1, VEGF, and PDGF-BB in freshly harvested lipoaspirate after centrifugation and incubation. *Plastic and reconstructive surgery*, 2009; 123(3): 826-833.
13. Yamaguchi, M., et al., Revascularization determines volume retention and gene expression by fat grafts in mice. *Experimental Biology and Medicine*, 2005; 230(10): 742-748.

14. Cervelli, V., et al., Autologous platelet-rich plasma mixed with purified fat graft in aesthetic plastic surgery. *Aesthetic plastic surgery*, 2009; 33(5): 716-721.
15. Nakamura, S., et al., Platelet-rich plasma (PRP) promotes survival of fat-grafts in rats. *Annals of plastic surgery*, 2010; 65(1): 101-106.
16. Park, B., et al., The effect of epidermal growth factor on autogenous fat graft. *Aesthetic plastic surgery*, 2011; 35(5): 738-744.
17. Marra, K.G., et al., FGF-2 enhances vascularization for adipose tissue engineering. *Plastic and reconstructive surgery*, 2008; 121(4): 1153-1164.
18. Hiraoka, Y., et al., In situ regeneration of adipose tissue in rat fat pad by combining a collagen scaffold with gelatin microspheres containing basic fibroblast growth factor. *Tissue engineering*, 2006; 12(6): 1475-1487.
19. Hong, L., et al., Promoted bone healing at a rabbit skull gap between autologous bone fragment and the surrounding intact bone with biodegradable microspheres containing transforming growth factor- β 1. *Tissue engineering*, 2000; 6(4): 331-340.

20. Kimura, Y., et al., Adipose tissue engineering based on human preadipocytes combined with gelatin microspheres containing basic fibroblast growth factor. *Biomaterials*, 2003; 24(14): 2513-2521.
21. Vashi, A.V., et al., Adipose tissue engineering based on the controlled release of fibroblast growth factor-2 in a collagen matrix. *Tissue engineering*, 2006; 12(11): 3035-3043.
22. Murillo, W.L., Buttock augmentation: Case studies of fat injection monitored by magnetic resonance imaging. *Plastic and reconstructive surgery*, 2004; 114(6): 1606-1614.
23. Coleman, S.R., Structural fat grafts: the ideal filler? *Clinics in plastic surgery*, 2001; 28(1): 111-119.
24. Coleman, S.R., Structural fat grafting: more than a permanent filler. *Plastic and reconstructive surgery*, 2006; 118(3S): 108S-120S.
25. Locke, M.B. and T.M. de Chalain, Current practice in autologous fat transplantation: suggested clinical guidelines based on a review of recent literature. *Annals of plastic surgery*, 2008; 60(1): 98-102.

26. Craft, R.O., et al., Effect of local, long-term delivery of platelet-derived growth factor (PDGF) on injected fat graft survival in severe combined immunodeficient (SCID) mice. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*, 2009; 62(2): 235-243.
27. Kim, S.J., et al., The effect of platelet-rich plasma (PRP) on the survival of the autologous fat graft. *Journal of the Korean Society of Plastic and Reconstructive Surgeons*, 2007; 34(3): 291-297.
28. Guerrerosantos, J., et al., Long-term survival of free fat grafts in muscle: an experimental study in rats. *Aesthetic plastic surgery*, 2004; 20(5): 403-408.
29. Nishimura, T., et al., Microvascular angiogenesis and apoptosis in the survival of free fat grafts. *The Laryngoscope*, 2000; 110(8): 1333-1338.
30. Aygit, A.C., et al., The fate of intramuscularly injected fat autografts: An experimental study in rabbits. *Aesthetic plastic surgery*, 2004; 28(5): 334-339.
31. Nakamura, S., et al., Increased survival of free fat grafts and vascularization in rats with local delivery of fragmin/protamine microparticles containing FGF-2 (F/P MP-F). *Journal of Biomedical*

Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 2011; 96(2): 234-241.

32. Yamada, S., et al., Fibroblast growth factor is stored in fiber extracellular matrix and plays a role in regulating muscle hypertrophy. Medicine and science in sports and exercise, 1989; 21(5 Suppl): S173-80.

33. Coleman, M.E., et al., Myogenic vector expression of insulin-like growth factor I stimulates muscle cell differentiation and myofiber hypertrophy in transgenic mice. Journal of Biological Chemistry, 1995; 270(20): 12109-12116.

34. Musarò, A., et al., Localized Igf-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle. Nature genetics, 2001; 27(2): 195-200.

35. Lee, S., et al., Viral expression of insulin-like growth factor-I enhances muscle hypertrophy in resistance-trained rats. Journal of applied physiology, 2004; 96(3): 1097-1104.

36. Barton-Davis, E.R., et al., Viral mediated expression of insulin-like growth factor I blocks the aging-related loss of skeletal muscle function. Proceedings of the national academy of sciences, 1998; 95(26): 15603-15607.

Abstract

Effect of fibroblast growth factor on the intramuscularly-injected fat and the muscle morphology : an experimental study in rats

Hong Jin Myung

Dept. of Medicine, Medicine Major

The Graduate School

Seoul National University

Introduction

This study demonstrate the positive effect of Fiblast® (Trafermin) which is related to fibroblast growth factor (FGF) in fat histological change when it is used in intramuscular fat injection. And also conduct morphologic change of muscle after intramuscular fat injection.

Methods

Eighteen Wistar rats were used in this study. 18 rats were divided in 2 groups, one group were injected fat only in Gluteus superficialis muscle and the other group were injected fat and FGF in muscle. As control PBS was injected to contralateral muscle. Because FGF has short half-live, 3 additional injection of FGF was done with one week interval. After 3 months the rats were sacrificed and fat injected muscle and control muscle were harvested. Then muscle was embedded in paraffin block and slide was made. After H&E staining microscopic

analysis was done with fat histological change related parameters (fat degeneration, fibrosis, inflammation and angiogenesis). Morphologic change of muscle was done by measuring the diameter of gross muscle and muscle fiber. .

Results

Comparison analysis was done in 4 parameters (Fat degeneration, fibrosis, inflammation, and angiogenesis) but there was no statistically significance between 2 groups. But there was positive tendency of angiogenesis when FGF was mixed to fat injection without statistically significance. When fat was injected to muscle, gross diameter of muscle except fat volume had no statistically difference between 2 groups, but muscle fiber diameter were increased when fat or fat + FGF were injected with statistically significance.

Conclusion

In this study FGF was no positive effect in intramuscular injected fat. When fat is injected to muscle to increase muscle volume, there was no evidence of muscle injury like muscle diameter decrease. And also injected fat increase muscle fiber diameter in both group especially in fat only injected group. But the difference of muscle fiber between 2 groups was not significant in clinical view point. Further study is needed to elucidate the effect of FGF with long term follow up and using continuous delivery system.

Keywords: Fat graft, Fiblast growth factor, Fiblast[®], Muscle fiber

Student number: 2013-21716